

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590466

研究課題名（和文） 発現遺伝子解析によるベネズエラ糞線虫の感染機構の解明

研究課題名（英文） Studies on the infection mechanisms of *Strongyloides venezuelensis* by analyzing genes expressed in infective larvae.

## 研究代表者

丸山 治彦 (MARUYAMA HARUHIKO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：90229625

研究成果の概要（和文）：ネズミ類に寄生する腸管寄生線虫であるベネズエラ糞線虫の感染幼虫の発現遺伝子を、コンベンショナルな EST ライブラリと新型シーケンサによる大規模解析で分析した。感染幼虫特異的に発現している遺伝子の多くは機能不明であったが、複数のアスタシン様メタロプロテアーゼがあり、宿主侵入に際し機能していると考えられた。さらに、宿主侵入後に発現するメタロプロテアーゼも多数みられ、寄生適応におけるアスタシン様メタロプロテアーゼの重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Gene expression of infective larvae of *Strongyloides venezuelensis*, an intestinal nematode of rodents, was examined by means of conventional EST analysis and a large-scale sequencing with a next generation pyrosequencer. Nearly half of the genes which were expressed specifically in the infective larva stage coded novel proteins of unknown function, though several genes for astacin-like metalloprotease were detected. These zinc-metalloproteases could account for the skin invasion of infective larvae upon infection. Astacin-like metalloproteases appeared to form a large gene family, suggesting its importance in parasitism.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：線虫、トランスクリプトーム、糞線虫、メタロプロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

土壌媒介性寄生虫による疾病は、熱帯や亜熱帯地域において深刻な健康被害と社会的損失をもたらしているものの、代表的な「顧みられない病気」であり、感染メカニズムや病原体の生物学に関する研究は限られている。

糞線虫は腸管寄生性の線虫で、「感染幼虫」

と呼ばれる感染型の幼虫が土壌中に潜み、摂食せずに宿主を待っている。感染幼虫はいったん宿主に接触すると直ちに宿主への侵入を開始する。糞線虫の感染幼虫が、外界の環境に低栄養状態で耐えることができるのはなぜか、どのようなメカニズムで宿主にすばやく侵入できるのかなど、さまざまなことが明らかになっていない。

また、ヒトの糞線虫症では宿主体内で感染幼虫が発育し、それがすぐに宿主に感染する「自家感染」という現象があり、何十年も感染が持続する。宿主の免疫力が低下すると多数の感染幼虫が体内で形成されるようになり、寄生虫体数が指数関数的に増加して重症糞線虫症という病態を招来する。わが国においても重症糞線虫症による死亡例は現在も報告されている。

以上のように、感染幼虫は、糞線虫という寄生虫、また糞線虫症という病気を理解する上できわめて重要な鍵を握っている。

## 2. 研究の目的

感染幼虫の生物学を理解することは、糞線虫という寄生虫を理解するのに不可欠であるだけでなく、感染制御の新手法の開発にもつながる。そこで、感染幼虫という発育段階において糞線虫はどのような活動をしているのかを、発現遺伝子の網羅的解析により明らかにする。つまり感染幼虫段階に特異的に発現がみとめられる遺伝子を同定し、その発現を抑制し、宿主侵入ないし低栄養状態で待機可能な分子機構を明らかにする。さらに、宿主侵入後に発現が開始される遺伝子群も同定し、「宿主内」という環境に寄生虫がどう対応しているのかを、分子レベル推定する基盤を構築する。

## 3. 研究の方法

材料は、実験動物であるマウスやラットに感染可能な糞線虫の一種、ベネズエラ糞線虫を用いた。ベネズエラ糞線虫の各ステージの虫体は以下の方法で得た。

虫卵：感染ラット糞便から飽和食塩水法

感染幼虫：感染ラット便の糞便培養

肺移行幼虫：感染3日後のマウスの肺からバールマン法

成虫：感染ラット腸管からバールマン法

### (1) コンベンショナルな cDNA ライブラリによる感染幼虫の EST 解析

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫から polyA+ mRNA を調製し、pDNR-LIB ベクターに cDNA を挿入して大腸菌 DH10B をトランスフォームしライブラリを作製した (SMART cDNA ライブラリキット、クロンテック社)。

組換え大腸菌 500 クロウンをランダムに選んで挿入配列を PCR 増幅し、5'側から塩基配列を決定した。得られた EST 配列からベクター部分を取り除き、250 bp より長い 408 配列を Sequencher (ジーンコード社) を用いてアセンブルした。アセンブルによって得られたコンティグ配列は、NEMABASE4、NCBI non-redundant タンパク質データベース、および NCBI EST データベースに対して相同性検索を実施した。

### (2) ベネズエラ糞線虫のトランスクリプトーム解析

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫特異的な遺伝子を網羅的に実施するため、上述のコンベンショナルな方法に加えて、次世代シーケンサを用いたトランスクリプトーム解析をおこなった。

ベネズエラ糞線虫の虫卵、感染幼虫、肺ステージの幼虫および成虫から cDNA を作製し、高速シーケンサ 454 GS-FLX Titanium によって塩基配列を決定した。次いで Newbler によりアセンブルし isotig/isogroup を得た。

次いで、大規模アノテーションを Blast2GO プログラムでおこなうとともに、相対的発現量を推定するため、各 isotig がどれくらいのリードを背景にしているかを、isotig を問い合わせ配列にして元リードのデータを検索することで調べ、感染幼虫の時期に特異的に発現が見られるトランスクリプトームを同定した。

### (3) ベネズエラ糞線虫のゲノム解析

発現遺伝子解析をより高精度に実施するため、ベネズエラ糞線虫の感染幼虫  $2.8 \times 10^6$  隻からゲノム DNA を抽出し、次世代型シーケンサ 454 GS FLX を用いて塩基配列を解読した。このシーケンサを採用した理由は、ベネズエラ糞線虫の近縁種のゲノム情報が皆無であるため、リード長がもっとも長い本機種が優位であると判断したからである。解読によって得られた塩基配列断片を Newbler アセンブラによってアセンブルして連続配列 (コンティグ) を得た。

## 4. 研究成果

### (1) ベネズエラ糞線虫感染幼虫の EST 解析

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫 cDNA ライブラリのクローンをランダムに 500 選んでシーケンスしたところ、十分に長く (>250 bp) 品質のよい配列が 408 クロウンから得られた。これらをアセンブルしたところ 162 のコンティグに集約され、そのうち 84 配列に対して有意なアノテーションを付けることができた。アノテーションによって推定された、感染幼虫が発現しているタンパク質は、呼吸酵素、ヒートショックタンパク質、神経筋タンパク質、タンパク分解酵素、そしていわゆる主要抗原と呼ばれるものであった。

発現量をクロウン頻度によって推定すると、発現量 (転写量) の多いタンパク質は、リパーゼ、グロビン様タンパク質、Hsp20 などであったが、アノテーションの付いていないものあるいは新規遺伝子が多くを占めていた。

興味深いことに、162 コンティグのうち公共データベース上に相同配列を認めないも

のが 37 個 (22.3%) 存在した。データベースには、ベネズエラ糞線虫と同属の *S. stercoralis* や *S. ratti* の EST が含まれるので、これら 37 個は種特異的な遺伝子の可能性が高いと考えられた。

感染幼虫に特異的な転写産物を同定するために、62 個のコンティグについて各発育ステージの虫体から調製した RNA を用いて RT-PCR を実施した。その結果、7 つのトランスクリプトが感染幼虫特異的であり、うち 2 つは、データベース上に相同配列のない新規遺伝子であることが分かった。有意なアノテーションが付いたものには、Hsp-20 およびアスタシン様メタロプロテアーゼがあった。

このメタロプロテアーゼは、糞線虫 *S. stercoralis* で報告されている分子量約 40kDa のアスタシン様メタロプロテアーゼ、ストロンジアスタシンと相同であり、感染幼虫の経皮感染に欠かせないとされている(図 1)。そこで ORF 全長の塩基配列を決定して組換えタンパク質を作製すると共に、遺伝子ノックダウン用ベクターにサブクローニングし、遺伝子ノックダウンを試みた。

感染幼虫は摂食行動をしないとされることから、最初に L1 幼虫が RNA を取り込むかどうかを検討した。PBS 中に 1mg/ml の Alexa Fluor 488 標識ウシ血清アルブミン (BSA) を加え、14 時間後に虫体を回収して蛍光顕微鏡で観察したところ虫体の腸管が蛍光を発していた。よって、L1 幼虫は PBS 中の物質を取り込むことが確認できた。そこでアスタシン様メタロプロテアーゼ配列の二本鎖 RNA を調製して L1 幼虫をインキュベートしたが、感染幼虫期の mRNA を抑制する効果はまったくみられなかった。

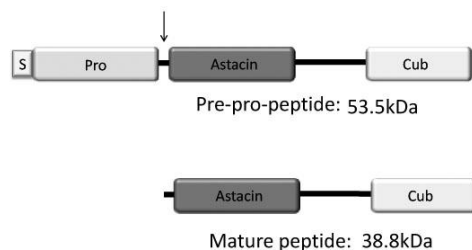


図 1 ベネズエラ糞線虫の感染幼虫メタロプロテアーゼの構造 成熟タンパクはアスタシンドメインと Cub ドメインから構成される (矢印は推定自己消化サイト)

## (2) 新型シーケンサによるベネズエラ糞線虫のトランスクリプトーム解析

### ① シーケンシングとアノテーション

ベネズエラ糞線虫の虫卵(含第 1 期幼虫)、感染幼虫、肺移行期幼虫、そして成虫から調製した cDNA を 454 GS-FLX Titanium によってシーケンスし、それぞれの発育ステージについて、543,713、622,248、679,257、638,728 個のリードが得られた。次にこれらのリード

をすべてプールし、Newbler 2.3 によってアセンブルした。得られた isotig からラット、細菌、バクテリアの配列とリボソーム RNA 配列を除き、最終的に 13,981 の isotig (9,843 isogroups) をベネズエラ糞線虫のトランスクリプト配列として得ることができた。

転写産物がどのような機能をもったタンパク質をコードしているかを、タンパク質機能データベース InterPro を参照して推定した。もっとも頻繁に出現したタンパクファミリーは 7 回膜貫通型 GPCR で、以下神経伝達イオンチャンネル、GTP 結合タンパク質、Ras と続いた。ドメイン分析ではキナーゼドメインの出現頻度がきわめて高かった。以上より化学物質受容、神経伝達、細胞内シグナル伝達に関するタンパク質の転写産物が多いことが推定された。

### ② 発育ステージ特異的タンパク質

シーケンシングに用いた cDNA は標準化されていないものを用いたので、特定の isotig に対応するリードが何回出現するのかをカウントすることによって、それぞれの isotig の異なった発育ステージ(虫卵と第 1 期幼虫、感染幼虫、肺移行期幼虫、成虫)における発現量を推定した。

虫卵と第 1 期幼虫ではコラーゲンやチロシナーゼなどクチクラなどの構造タンパク質の発現が多く見られ、成虫期では虫卵形成に関与するタンパク質、あるいはアセチルコリンエステラーゼなどが目立った。

	genome	transcripts		genome	transcripts
NAS-1	2	2	NAS-21	0	0
NAS-2	0	0	NAS-22	0	0
NAS-3	0	0	NAS-23	5	5
NAS-4	2	1	NAS-24	0	0
NAS-5	2	1	NAS-25	2	0
NAS-6	1	0	NAS-26	2	1
NAS-7	1	1	NAS-27	4	1
NAS-8	1	1	NAS-28	1	1
NAS-9	1	0	NAS-29	1	0
NAS-10	4	3	NAS-30	4	5
NAS-11	0	0	NAS-31	6	1
NAS-12	1	1	NAS-32	1	0
NAS-13	2	1	NAS-33	4	5
NAS-14	2	0	NAS-34	132	117
NAS-15	1	0	NAS-35	7	12
NAS-16	0	0	NAS-36	5	1
NAS-17	1	0	NAS-37	13	1
NAS-18	0	0	NAS-38	0	0
NAS-19	0	0	NAS-39	3	0
NAS-20	0	0			

表 1 ベネズエラ糞線虫のゲノムおよびトランスクリプトームに存在するアスタシン様メタロプロテアーゼ。C. elegans の NAS-1 から NAS-39 のうち、NAS-34 に相同なものが突出し

て多い

一方、感染幼虫ステージでは、特異的と判定されたもののうち、半数近く (17/36) が機能不明の転写産物であり、このステージの特殊性がさらに裏付けられた。そして機能が推測されるタンパク質のうち3種類が、コンベンショナルな EST 解析でも検出されたアスタシン様メタロプロテアーゼであった。

ひとつのステージではなく、発現が感染後に上昇する転写産物 (寄生に必要なタンパク質の可能性が高い) のリストでは、複数の種類のアスタシン様メタロプロテアーゼとアセチルコリンエステラーゼがみとめられた。以上のように、アスタシン様メタロプロテアーゼはベネズエラ糞線虫では大きな遺伝子ファミリーを形成して、発現ステージによって機能分化している可能性が示唆されたので、この遺伝子ファミリーについて特に詳しく調べた。

### ③ アスタシン様メタロプロテアーゼ

*C. elegans* のゲノムには 39 種類のアスタシン様メタロプロテアーゼ遺伝子 (NAS-1~NAS39) が存在する。これらの配列に対してベネズエラ糞線虫のトランスクリプトームを検索すると、ほとんどの NAS に対してはヒットする isotig は 0 個からせいぜい 5 個までなのに対し、NAS-34 に対しては 117 個もの isotig がヒットした (表 1)。そしてそのうち 4 個が感染幼虫特異的であり、多数は体内移行期以後に発現がみとめられた。

このように多数の類似した配列のトランスクリプトが存在することは実験前にはまったく予想外であり、これがアスタシン様メタロプロテアーゼの遺伝子ノックダウンが成功しなかった原因であると考えられた。

### ④ その他新規に得られた知見

ベネズエラ糞線虫のトランスクリプトーム配列を他線虫類のゲノムまたは EST に対して検索をかけたところ、動物寄生性線虫には相同分子があるが自由生活種あるいは植物寄生性線虫には見られない isogroup が 622 個得られた。

この中で有意のアノテーションが付いたものは 92 に過ぎなかったが、その中でヘム合成系の最後のステップを触媒するフェロケラターゼ遺伝子が注目された。なぜならば、一般的に自由生活線虫はヘム合成系の酵素群をすべて欠損しておりフェロケラターゼも持っていない。ところが、動物寄生性の線虫であるフィラリア類や糞線虫類では、理由は不明だがフェロケラターゼ遺伝子だけは所持していたからである。

ベネズエラ糞線虫のフェロケラターゼ遺伝子の塩基配列を他生物種のそれと比較したところ、後生動物よりもバクテリアのフェロケラターゼに近いことが分かった。また、

次に述べるようにベネズエラ糞線虫のゲノム配列情報を得たので、フェロケラターゼ cDNA に対応するゲノム配列を調べた。すると、明らかにイントロンが存在していたことから、このフェロケラターゼ遺伝子は、バクテリア配列のコンタミネーションではなく、真にベネズエラ糞線虫が持っている遺伝子であることが分かった。

### (3) ベネズエラ糞線虫のゲノム解析

次世代型シーケンサ 454 GS FLX を用いて、ベネズエラ糞線虫のゲノムフラグメントを 3 ラン実行した。総リード数は 3,328,710 であり (平均長 373 bp)、解読総塩基数は 1,246 Mb に達した。アセンブル後の塩基数 (推定ゲノムサイズ) は約 55 Mb で、*C. elegans* の約半分であった。

上述したとおりにトランスクリプトーム解析によって NAS-34 に対しては 117 個の isotig がヒットしたので、ゲノムについても *C. elegans* の NAS に相同な配列がどれだけあるかカウントした。その結果、NAS-34 と相同な配列は 132 個見付き、やはりアスタシン様メタロプロテアーゼは大きなファミリーを形成し、しかもそのほとんどが発現しているらしいことが明らかとなった (表 1)。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Yoshida A, Nagayasu E, Nishimaki A, Sawaguchi A, Yanagawa S, Maruyama H: Transcripts analysis of infective larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. Parasitol Int 60: 75-83, 2010 査読有
- ② Sakata-Yanagimoto M, Sakai T, Maruyama H, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Kurokawa M, Ogawa S, Yasutomo K, Chiba S: Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine. Blood 117: 128-34, 2010 査読有
- ③ Yoshida A, Nagayasu E, Horii Y, Maruyama H: A novel C-type lectin identified by EST analysis in tissue migratory larvae of *Ascaris suum*. Parasitol. Res. 110:1583-1586, 2012. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① Ayako Yoshida, Eiji Nagayasu, Yoichiro Horii, Haruhiko Maruyama: Gene expression analysis of lung stage larvae of *Ascaris suum*, the swine large intestinal roundworm. 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep. 8-11, Awaji Yumebutai

- International Conference Center, Awaji, Japan, 2009
- ②Eiji Nagayasu, Ayako Yoshida, Haruhiko Maruyama: A bioinformatics approach to identify immunodiagnostic antigens for strongyloidiasis. 8th Asia-Pacific Travel Health Conference, Nara, Japan, October 20-23, 2010
- ③Eiji Nagayasu, Yoshitoshi Ogura, Takehiko Ito, Ayako Yoshida, Tetsuya Hayashi and Haruhiko Maruyama: Genome and transcriptome sequencing of *Strongyloides venezuelensis*, an animal parasitic nematode. 45th Annual Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases, Tokyo, Japan, Jan 10-11, 2010
- ④Ayako Yoshida, Nobuo Ohta, Haruhiko Maruyama: Depletion of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells down-regulates parasite clearance during early phase of Plasmodium chabaudi AS infection in A/J mice. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August 22-27, 2010
- ⑤Yoshida A, Nagayasu E, Yoichiro Horii, Naotoshi Tsuji, Hiroshi Yamasaki, Maruyama H: Serological diagnosis of Visceral Larva Migrans with recombinant antigens from *Toxocara* and *Ascaris*. 8th Asia-Pacific Travel Health Conference, Nara, Japan, October 20-23, 2010
- ⑥Eiji Nagayasu, Ayako Yoshida, Haruhiko Maruyama: Large-scale gene expression analysis of different developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*, a rodent intestinal nematode. 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, Sep. 7-10, 2010
- ⑦Chakraborty G, Nagayasu E, Yoshida A, Maruyama H: Development of Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid and sensitive detection of *Strongyloides*, XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo, Japan, September 6-10, 2011
- ⑧Nagayasu E, Ogura Y, Ito T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H: Transcriptome sequencing of *S. venezuelensis*, an animal parasitic nematode. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo, Japan, September 6-10, 2011
- ⑨Maruyama H: Genome and transcriptome analysis of *Strongyloides venezuelensis*, an intestinal nematode of rats. (Symposium: What Makes Worms Parasitic? - Understanding the Molecular Basis for Parasitism), XIII International Congress of Bacteriology and

Applied Microbiology, Sapporo, Japan, September 6-10, 2011

- ⑩長安英治、伊藤武彦、小椋義俊、吉田彩子、林哲也、丸山治彦、ベネズエラ糞線虫のゲノム・トランスクリプトーム解析、第80回日本寄生虫学会大会（東京）、2011年7月17-18日

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.miyazaki-med.ac.jp/parasitology/default.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸山 治彦 (MARUYAMA HARUHIKO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：90229625

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし